

Messa a punto del metodo di estrazione e determinazione analitica, tramite HPLC, dell'amfotericina B su campioni ematici

Eleonora Castellana,¹ Paola Milla,² Maria Rachele Chiappetta,¹ Luigi Cattel,² Francesco Cattel¹

1. S.C. Farmacia, A.O.U. Città della Salute e della Scienza di Torino

2. Dipartimento di Scienza e Tecnologia del Farmaco, Università di Torino

Riassunto. In Italia, sono disponibili due formulazioni lipidiche di amfotericina B (AMFB): associata a complessi lipidici (Abelcet) e liposomiale (Ambisome). Queste presentano differenze peculiari importanti come stabilità e distribuzione tissutale. La farmacocinetica dell'AMFB nella pratica clinica, nonostante sia un elemento importante per la scelta della formulazione ottimale da utilizzare in ogni singolo caso, rimane poco studiata. Scopo di questo lavoro è quello di mettere a punto una metodica di estrazione e determinazione analitica dell'AMFB, da campioni di sangue intero di pazienti, per fornire un metodo di valutazione della farmacocinetica. L'AMFB viene estratta da campioni di 200 µl di sangue intero dopo precipitazione delle proteine tramite 200 µl di metanolo e 400 µl di dimetilsolfossido. L'analisi viene condotta tramite HPLC-UV su colonna C18 (LiChrospher® 100 RP-18, 250-4, 5 µm, Waters) eluita in isocratica ad 1 ml/min con una miscela di acetonitrile e ammonio acetato 5mM (45:55). In queste condizioni il tempo di ritenzione dell'AMFB è di circa 7 minuti. L'assorbanza dell'eluato viene rilevata mediante un detector UV/VIS a $\lambda=404$ nm. Con questa metodica è stata costruita una retta di taratura in un range da 0,1 a 1 µg/ml. È stato condotto uno studio di stabilità e fotosensibilità in varie condizioni di conservazione. La messa a punto delle metodiche di estrazione dell'AMFB da sangue intero si è basata sul metodo descritto da R. Lopez-Galera. Dalle prove di stabilità si evince che l'AMFB rimane stabile per almeno 24 ore a temperatura ambiente anche se sottoposta a luce artificiale, mentre viene in minima parte degradata dopo conservazione di 10 giorni a 4°C, risultando invece stabile se conservata a -20°C. La retta di taratura risulta lineare nel range considerato, l'equazione è: $y = 0,0553x + 0,5011$, dove y rappresenta l'area del picco e x i ng di AMFB nei 200µl di sangue estratto. Il coefficiente di regressione della retta è: $R^2 = 0,9994$. La minima concentrazione misurabile, 0,1 µg/ml, rende il metodo applicabile agli studi farmacocinetici in pazienti. Il metodo ha permesso di definire un protocollo efficace, semplice, rapido ed economico per l'estrazione e la determinazione analitica dei parametri farmacocinetici dell'AMFB. Dopo aver messo a punto il metodo per la determinazione dell'AMFB ematica, si potrà procedere con il reclutamento di pazienti, per poter confrontare la farmacocinetica delle due diverse forme farmaceutiche e definire linee guida utili per la scelta della formulazione più adatta alle diverse esigenze terapeutiche e profilattiche.

Parole chiave: Amfotericina B, Farmacocinetica, Amfotericina B liposomiale, Amfotericina B in complessi lipidici, HPLC.

Determination of analytical extraction and assay method by HPLC of amphotericin B on blood samples

Summary. In Italy, two lipidic formulations of amphotericin B (AMFB) are available: associated with lipid complexes (Abelcet) and liposomal (Ambisome). These have important peculiarities such as stability and tissue distribution. The pharmacokinetics of AMFB in clinical practice, despite being an important element for choosing the optimal formulation to be used in each individual case, remains poorly studied. The aim of this paper is to develop a method for extraction and analytical determination of AMFB, from whole blood samples to patients, to provide a pharmacokinetic evaluation method. The AMFB is extracted from samples of 200 µl of whole blood after protein precipitation with 200 µl of methanol and 400 µl of dimethylsulfoxide. The analysis was conducted by HPLC-UV column C18 (LiChrospher® 100 RP-18, 250-4, 5 µm, Waters) eluted in isocratic 1 ml/min with a mixture of acetonitrile and ammonium acetate 5mM (45:55). Under these conditions, the retention time of the AMFB is about 7 minutes. The eluate absorbance is detected by a UV/VIS detector at $\lambda=404$ nm. With this method a calibration line was constructed in a range of 0.1 to 1 µg/ml. A stability and photosensitivity study was carried out under various conservation conditions. The development of the whole blood extracted AMFB methods was based on the method described by R. Lopez-Galera. Stability tests show that AMFB remains stable for at least 24 hours at room temperature even if subjected to artificial light, while being minimally degraded after storage for 10 days at 4°C, and remaining stable if stored at -20°C. The calibration line is linear in the range considered, the equation is: $y = 0.0553x + 0.5011$, where y represents the area of the peak and x ng of AMFB in 200µl of extracted blood. The regression coefficient of the straight line is: $R^2 = 0,9994$. The lowest measurable concentration, 0.1µg/ml, makes the method applicable to pharmacokinetic studies in patients. The method has allowed defining an effective, simple, rapid and cost effective protocol for the extraction and analytical determination of the pharmacokinetic parameters of AMFB. After developing the method for determining AMFB in the blood, patients can be recruited in order to compare the pharmacokinetics of the two different pharmaceutical forms and to define guidelines for the choice of formulation that best suits the different therapeutic and prophylactic needs.

Key words: Amphotericin B, Pharmacokinetics, liposomal amphotericin B, amphotericin B lipid complex, HPLC.

Introduzione

La disponibilità di formulazioni associate a complessi o veicoli lipidici ha permesso di migliorare la tollerabilità infusiva dell'amfotericina B (AMFB), attenuandone soprattutto la tossicità renale, ed oggi queste formulazioni hanno ampiamente rimpiazzato quella originaria.^{1,2} In Italia sono disponibili due formulazioni lipidiche alternative, utilizzate nei pazienti oncoematologici ed intensivistici per la profilassi, terapia empirica e contro le infezioni fungine invasive: amfotericina B associata a complessi lipidici (ABLC, Abelcet) e amfotericina B liposomiale (Ambisome).

Nonostante quasi 50 anni di utilizzo clinico, la distribuzione plasmatica dell'amfotericina B desossicolato rimane però ancora poco conosciuta. Le due formulazioni presentano sostanziali differenze peculiari nella temperatura di stabilità del complesso amfotericina-lipide (Ambisome > ABLC), nella concentrazione massima raggiunta (Ambisome > ABLC) e nel volume di distribuzione (ABLC > Ambisome).³ Le differenze possono giustificare una migliore cinetica plasmatica o tissutale, creando così dubbi per il clinico sulla migliore e reale efficacia di una delle due formulazioni. Il clinico è anche spesso confuso dalla eterogenea metodologia di studio delle concentrazioni plasmatiche riportata in letteratura, talora espressa come concentrazione della molecola totale disponibile nel plasma o nel sangue, talora come dissociata dal veicolo o complesso lipidico.

Scopo di questo lavoro è stato quello di sviluppare ed ottimizzare un metodo analitico finalizzato alla messa a punto della metodica di estrazione e determinazione analitica dell'amfotericina B in sangue intero, utilizzabile per la valutazione dei parametri farmacocinetici in pazienti trattati con le diverse formulazioni in commercio.

La necessità di mettere a punto un metodo analitico su campioni di sangue intero deriva dall'osservazione che, dopo somministrazione di Abelcet, la maggior parte dell'amfotericina B (>90%) si localizza nel pellet dopo separazione della frazione plasmatica.⁴ La determinazione della farmacocinetica di entrambe le formulazioni di AMFB a partire da una stessa matrice biologica, il sangue intero, potrebbe quindi facilitare il confronto dei diversi profili farmacocinetici.

Materiali e metodi

Estrazione dell'amfotericina B da sangue intero

In letteratura sono descritte molte metodiche di analisi dell'amfotericina B da campioni biologici: per la messa a punto del nostro metodo ci siamo comunque basati su uno dei metodi più semplici, quello

descritto da R. Lopez-Galera,⁵ con lo scopo di rendere la metodica facilmente applicabile nei laboratori di analisi degli ospedali.

La messa a punto del metodo è stata effettuata su aliquote di sangue intero proveniente da un prelievo da volontario sano, alle quali vengono addizionate quantità note di AMFB standard (Amphotericin B European Pharmacopoeia Reference Standard della Sigma-Aldrich). Si trasferiscono 200 µL di sangue in un eppendorf e si agita su vortex per 30 secondi per renderlo omogeneo. A questo punto si aggiungono 200 µL di metanolo e 400 µL di dimetilsolfossido (DMSO). Si agita su vortex per 30 secondi, dopodiché si centrifuga per 10 minuti a 3000 rpm.

Al termine dei 10 minuti si preleva il surnatante e lo si filtra tramite un filtro da 0.45 micrometri; si prelevano 200 µL di filtrato e si iniettano in HPLC.

La semplicità del metodo garantisce una resa riproducibile e prossima al 100%, minimizzando il rischio di perdita dell'analita: per questo motivo abbiamo deciso di non utilizzare uno standard interno.

Strumentazione

Il sistema di HPLC utilizzato per l'analisi è composto da:

- Colonna: C18 Merck Lichrosphere;
- Pompa: Shimadzu LC10AD VP liquid chromatograph;
- Rivelatore Spettrofotometro: Shimadzu SPD 10 A VP UV-VIS detector;
- Software d'integrazione: Autochro Data Module Yonghin Instrument;
- L'eluizione del campione avviene in isocratica con miscela eluente costituita da 45% di acetonitrile e 55% di ammonio acetato 5mM.

L'assorbanza dell'eluato viene rilevata mediante un detector UV/VIS a $\lambda=404$ nm e le aree dei picchi vengono integrate automaticamente dal sistema informatico.

Il flusso in HPLC è di 1.0 mL al minuto.

In tali condizioni sperimentali la pressione in colonna è in media di 150 bar, e il tempo di ritenzione della amfotericina B è di circa 7 minuti.

Spettro UV-VIS della Amfotericina B

Prima di procedere con le analisi HPLC si è analizzato lo spettro di assorbimento della soluzione standard di amfotericina B tramite uno spettrofotometro UV-VIS, impostando la scansione tra 200 e 600 nm.

Fotosensibilità

La Farmacopea Europea segnala la fotosensibilità delle soluzioni diluite di AMFB, quindi vi è il rischio di

diminuzione della concentrazione del farmaco contenuto nei campioni analizzati dovuta alla degradazione nel caso di esposizione alla luce.⁶ Si decide quindi di effettuare uno studio preventivo di stabilità. Si prepara una soluzione madre di AMFB con concentrazione di 1 mg/mL in metanolo e DMSO in rapporto 1:2. Di questa vengono fatte varie aliquote, alcune delle quali vengono utilizzate immediatamente per l'analisi, mentre altre vengono esposte a luce artificiale (lampada fluorescente bianca) a temperatura ambiente per tempi crescenti fino a 24 ore, per simulare l'esposizione alla luce presente nel laboratorio analitico. La stabilità del farmaco viene valutata tramite dosamento in HPLC dopo diluizione 1:4000 con metanolo.

Stabilità a 4°C e a -20°C

Successivamente si è deciso di valutare la stabilità della amfotericina B nel caso in cui la soluzione madre venga conservata a 4°C oppure a -20°C. Questa, a concentrazione di 1 mg/mL in metanolo e DMSO in rapporto 1:2, viene divisa in eppendorf in aliquote da 200 µL, e conservata per 10 giorni in frigorifero a 4°C oppure in congelatore a -20°C, in modo da poter valutare, tramite comparazione con la soluzione appena preparata, la stabilità nelle due modalità di conservazione. L'intervallo di tempo valutato è di 10 giorni dopo la preparazione. La stabilità del farmaco viene valutata tramite dosamento in HPLC dopo diluizione 1:4000 con metanolo.

Retta di taratura

Per risalire dalle aree dei picchi alle quantità di farmaco iniettate in HPLC, e quindi alle concentrazioni di farmaco presente nel campione, è stata costruita una retta di taratura. Seguendo le metodiche precedentemente descritte, si analizzano vari campioni ematici privi di amfotericina B, ai quali sono state aggiunte concentrazioni note scalari di una soluzione standard di farmaco. Dall'analisi di questi standard, viene estrapolata l'equazione di una retta che descrive l'area dei picchi in funzione dei nanogrammi di farmaco in HPLC.

La retta di taratura con estrazione dal sangue è stata costruita nel range di concentrazione da 20 ng a 200 ng (20 ng; 50 ng; 100 ng; 200 ng) di amfotericina B. Per costruire la retta di taratura, si aggiungono quantità note di farmaco (0, 20, 50, 100, 200 ng/10µL) a 190µL di sangue: si parte dalla soluzione madre (1 mg/mL di amfotericina B in metanolo e DMSO in rapporto 1:2), che viene diluita in metanolo per ottenere le soluzioni figlie alla concentrazione opportuna, in modo da aggiungere la relativa quantità di farmaco in un volume di 10µL a 190µL di sangue. Si procede poi con l'estrazione dell'amfotericina B presente nel sangue mediante metanolo (200µL) e DMSO (400µL). 200 µL del farmaco estratto e filtrato, su di un filtro 0,45 micron, vengono iniettati in HPLC.

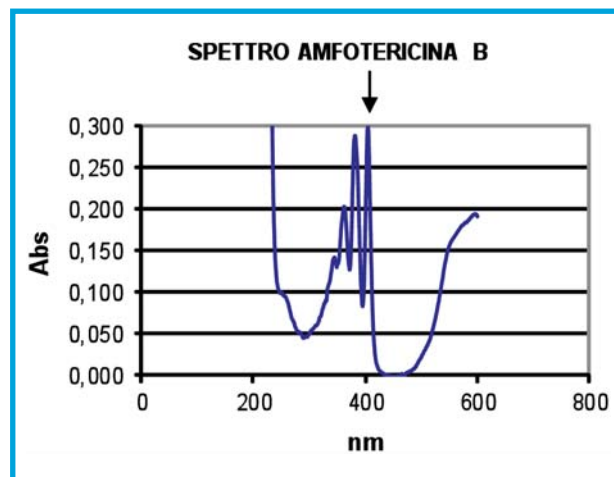
Risultati

Spettro UV-VIS della Amfotericina B

Lo spettro di assorbimento dell'amfotericina B presenta 3 picchi, tra i quali il più elevato a 404nm (Figura 1). Per l'analisi HPLC è stata quindi scelta la lunghezza d'onda di 404 nm.

FIGURA 1.

Spettro di assorbimento UV-VIS dell'amfotericina B



Fotosensibilità

Dalle prove di stabilità si evince che la amfotericina B rimane stabile per almeno 24 ore anche se sottoposta a luce artificiale. In Tabella I vengono riportati i risultati della prova di stabilità della amfotericina B 1 mg/ml esposta a luce artificiale a temperatura ambiente.

Tabella I. Percentuale di Amfotericina B recuperata dopo esposizione a luce artificiale e temperatura ambiente

Tempo	% Farmaco recuperato
0	100
30 min	97,93
60 min	98,84
105 min	99,24
24 ore	99,7

Stabilità a 4°C e a -20°C

In Tabella II sono riportati i risultati della prova di stabilità della amfotericina B 1 mg/ml conservata a 4°C o a -20°C per 10 giorni.

Tabella II. Percentuale di amfotericina B recuperata dopo 10 giorni di conservazione a 4°C e -20°

Tempo (giorni)	% Farmaco recuperato
0 (soluzione madre iniettata immediatamente dopo la preparazione)	100
Conservazione a 4°C per 10 giorni	97,19
Conservazione a -20°C per 10 giorni	99,03

Dalle prove di stabilità si evince che la amfotericina B viene in minima parte degradata dopo conservazione di 10 giorni a 4°C, mentre risulta stabile se conservata a -20°C.

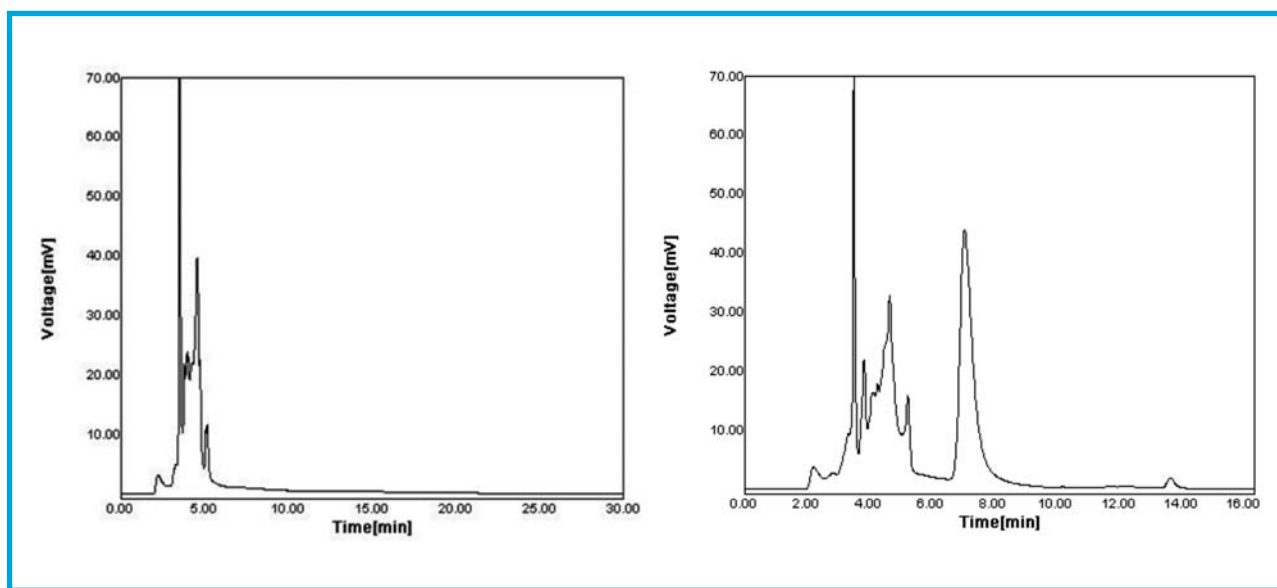
Retta di taratura

Dal cromatogramma si notano alcuni picchi iniziali dovuti ad altri componenti contenuti nel sangue, che però non interferiscono con l'analisi della amfotericina B in quanto questa ha un tempo di ritenzione di circa 7 minuti. L'analisi dell'estratto, rappresentato in Figura 2 "a", privo di amfotericina B, non evidenzia infatti picchi sovrapponibili a quelli del farmaco, si può notare invece, in Figura 2 "b", il picco relativo all'amfotericina B dopo circa 7 minuti di corsa cromatografica.

Il valore medio delle aree dei picchi ottenuti alle diverse concentrazioni di amfotericina B è riportato in Tabella III. Ogni analisi è stata condotta in triplicato.

FIGURA 2.

Cromatogramma di un estratto di sangue intero privo di farmaco, che evidenzia la mancanza di interferenze nella zona di rilevazione dell'amfotericina B a circa 7 min (a) e cromatogramma di un estratto di sangue intero al quale è stato aggiunto uno standard di amfotericina B in cui a 7 min è visibile il picco dell'amfotericina B (b)

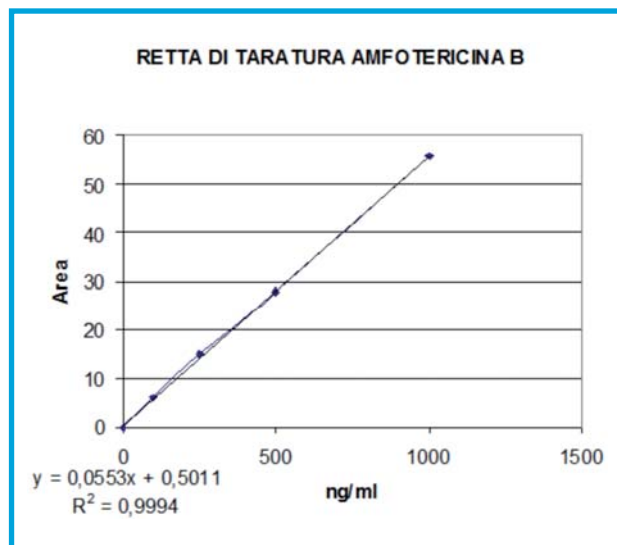
**Tabella III.** Valore medio delle aree ottenute durante l'analisi

Concentrazioni ng/mL	Area
100	6,06
250	15,22
500	27,8
1000	55,78

Dalle aree è stato possibile costruire una retta di taratura (Figura 3), la cui equazione, calcolata con il metodo dei minimi quadrati, è la seguente: $y = 0,0553x + 0,5011$ dove y rappresenta l'area del picco e x i ng di amfotericina B nei 200µL di sangue estratto.

Il coefficiente di regressione della retta è: $R^2 = 0,9994$.

FIGURA 3.
Retta di taratura dell'amfotericina B



Discussione

Presso il laboratorio di Farmacocinetica Clinica del Dipartimento di Scienza e Tecnologia del Farmaco dell'Università di Torino, in collaborazione con la S.C. Farmacia Città della Salute e della Scienza di Torino, è stato progettato uno studio di messa a punto della metodica di estrazione e determinazione analitica dell'amfotericina B in campioni di sangue intero, allo scopo di utilizzare tale metodica in studi clinici per la valutazione dei parametri farmacocinetici in pazienti trattati con amfotericina B associata a complessi lipidici o con amfotericina B liposomiale. In letteratura è stato infatti osservato che, dopo somministrazione di Abelcet, solo una parte di AMFB si recupera nel plasma dopo centrifugazione del sangue, mentre dopo somministrazione di Ambisome l'AMFB è presente soprattutto nella frazione plasmatica.^{4,7} Il metodo descritto in questo lavoro, che si basa sull'analisi di campioni di sangue intero, presenta quindi il vantaggio di permettere un confronto diretto della farmacocinetica delle due formulazioni, fornendo al clinico indicazioni sull'uso più appropriato per ogni tipologia di paziente.

Per la determinazione analitica dell'AMFB sono già descritti in letteratura altri metodi, che però spesso non sono applicabili facilmente in un normale laboratorio di analisi poiché richiedono, ad esempio, l'utilizzo di laboriose e costose procedure di estrazione in fase solida dell'analita dal campione biologico (difficilmente impiegabili, inoltre, sul sangue intero), oppure la preparazione di fasi mobili più complesse o l'impiego di strumentazione più sofisticata, come l'HPLC-massa.⁸⁻¹¹

La metodica da noi messa a punto prevede un'estrazione con metanolo e DMSO del farmaco dal sangue ed una cromatografia HPLC-UV su colonna C18 in isocratica. Il metodo è in grado di misurare quantità di amfotericina da 0,1 µg/ml fino a 1 µg/ml, dimostrandosi così adatto a studi di farmacocinetica.

Il metodo qui descritto è inoltre stato utilizzato per valutare la stabilità della amfotericina B conservata a temperatura ambiente per 24 ore sotto una fonte di luce artificiale, oppure dopo conservazione per 10 giorni a 4°C o a -20°C. L'amfotericina B ha dimostrato una buona stabilità alla luce artificiale per almeno 24 ore, per tempi di conservazione più lunghi è invece preferibile il congelamento a -20°C.

Conclusioni

Il metodo proposto è stato sviluppato con successo ed ha permesso di definire un protocollo efficiente, semplice, rapido, sensibile ed economico per l'estrazione e la determinazione analitica dell'AMFB da campioni di sangue, mediante l'utilizzo di un HPLC isocratico equipaggiato con rilevatore UV, strumentazione facilmente reperibile in un laboratorio di analisi.

Il metodo messo a punto verrà utilizzato in un prossimo trial clinico per il confronto della farmacocinetica delle due diverse forme farmaceutiche dell'AMFB. Si potrà procedere con il reclutamento di pazienti, per poter confrontare la farmacocinetica delle due diverse forme farmaceutiche, AMFB associata a complessi lipidici ABLC e liposomiale Ambisome, al fine di definire linee guida utili al clinico per la scelta della formulazione più adatta alle diverse esigenze terapeutiche e profilattiche dei pazienti trattati.

Bibliografia

1. Bekersky I, Boswell GW, Hiles R, et al. Safety and toxicokinetics of intravenous liposomal amphotericin B (AmBisome) in beagle dogs. *Pharm Res* 1999;16:1694-701.
2. Harbarth S, Pestotnik SL, Lloyd JF, et al. The epidemiology of nephrotoxicity associated with conventional amphotericin B therapy. *Am J Med* 2001;111:528-34.
3. Meletiadis J, Chanock S, Walsh TJ. Human pharmacogenomic variations and their implications for antifungal efficacy. *Clin. Microbiol Rev* 2006;19:763-87.
4. Dupont B. Overview of the lipid formulations of amphotericin B. *Journal of Antimicrobial Chemotherapy* 2002;49:31-6.
5. Adedoyin A, Bernardo JF, Swenson CE, et al. Pharmacokinetic profile of ABELCET (amphotericin B lipid complex injection): combined experience from phase I and phase II studies. *Antimicrob Agents Chemother* 1997;41(10):2201-8.

5. Lopez-Galera R, Pou-Clave L, Pascual-Mostaza C. Determination of amphotericin B in human serum by liquid chromatography. 1995;298-300.
6. Monografia Amphotericin B in The International Pharmacopoeia Sixth Online Edition, 2016 <http://apps.who.int/phint/pdf/b/Jb.6.1.24.pdf>. (Luglio 2017).
7. Ramaswamy M, Wasan KM. Differences in the method by which plasma is separated from whole blood influences amphotericin B plasma recovery and distribution following amphotericin B lipid complex incubation within whole blood. Drug Dev Ind Pharm 2001;27(8):871-5.
8. Campanero MA, Zamarreño AM, Diaz M, Dios-Vieitez MC, Azanza JR. Development and validation of an HPLC method for determination of amphotericin B in plasma and sputum involving solid phase extraction Chromatographia 1997;46(11-12):641-6.
9. Egger P, Bellmann R, Wiedermann CJ. Determination of amphotericin B, liposomal amphotericin B, and amphotericin B colloidal dispersion in plasma by high-performance liquid chromatography. J Chromatogr B Biomed Sci Appl 2001;760(2):307-13.
10. Golas CL, Prober CG, MacLeod SM, Soldin SJ. Measurement of amphotericin B in serum or plasma by high-performance liquid chromatography. J Chromatogr. 1983;278(2):387-95.
11. Qin W, Tao H, Chen Y, Chen Z, Wu N. Sensitive, accurate and simple liquid chromatography-tandem mass spectrometric method for the quantitation of amphotericin B in human or minipig plasma. J Chromatogr Sci 2012; 50(7):636-43.

Indirizzo per la corrispondenza:

Eleonora Castellana

A.O.U. Città della Salute e della Scienza di Torino

C.so Bramante, 88

10100 Torino

E-mail: ecastellana@cittadellasalute.to.it